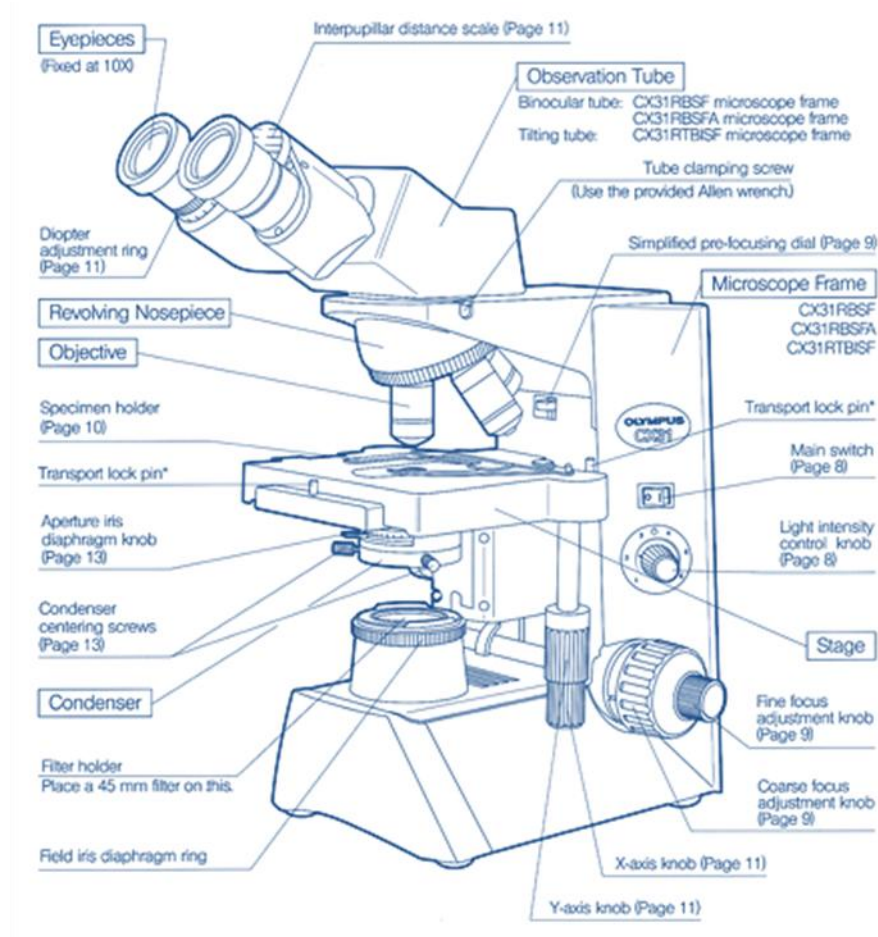
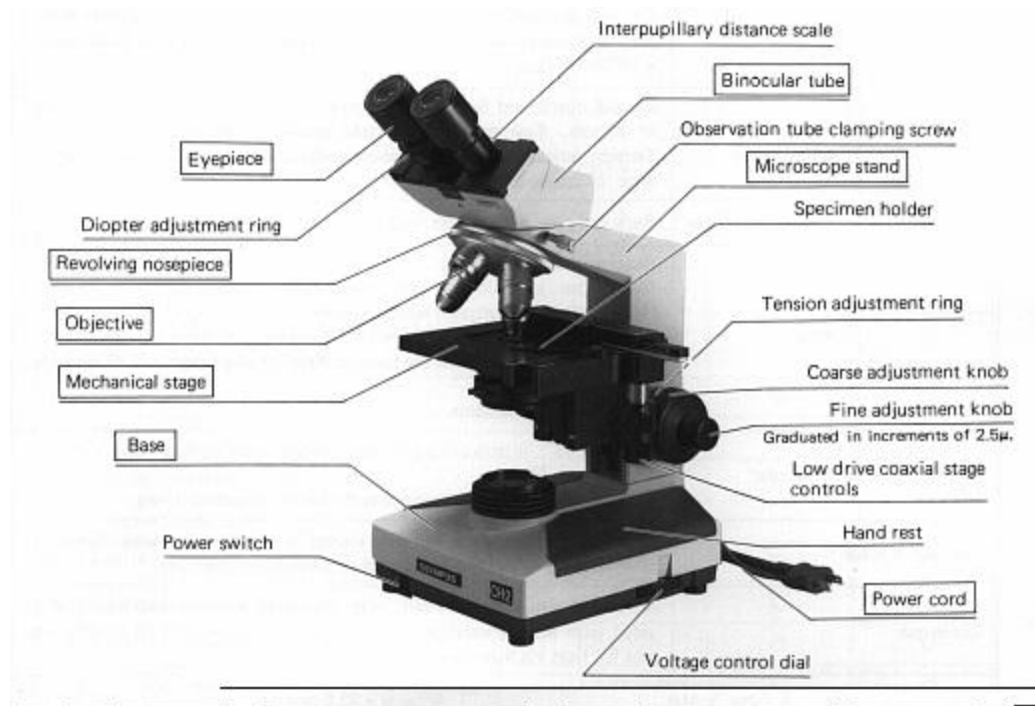
Microscopia

(Esta passagem foi adaptada de *Microbiology: A Laboratory Manual, 5th edition, Cappuccino, JS and Sherman, N., Benjamin / Cummings Science Publishing.)*

Objetivos

1. Familiarizar-se com a história e a diversidade dos instrumentos microscópicos.

2. Para entender os componentes, o uso e os cuidados do microscópio de campo claro composto.

3. Para aprender o uso correto do microscópio para observação e medição de microrganismos.

INTRODUÇÃO

A microbiologia, o ramo da ciência que tão ampliou e expandiu nosso conhecimento do mundo dos vivos, deve sua existência a *Antony van Leeuwenhoek.* Em 1673, com o auxílio de um microscópio bruto composto por uma lente bicôncava fechada em duas placas de metal, *Leeuwenhoek* apresentou ao mundo a existência de formas de vida microbianas. Ao longo dos anos, os microscópios evoluíram do instrumento simples de lente única de *Leeuwenhoek,* com uma ampliação de 300, para os atuais microscópios eletrônicos capazes de ampliações superiores a 250.000. Microscópios são designados como microscópios de luz ou microscópios eletrônicos. Os primeiros usam luz visível ou raios ultravioleta para iluminar as amostras. Eles incluem instrumentos de campo claro, campo escuro, contraste de fase e fluorescente. Os microscópios fluorescentes usam radiações ultravioletas cujos comprimentos de onda são mais curtos que os da luz visível e não são diretamente perceptíveis ao olho humano. Microscópios eletrônicos usam feixes de elétrons em vez de raios de luz e ímãs em vez de lentes para observar partículas submicroscópicas.

Recursos essenciais de vários microscópios

Microscópio de campo claro

Este instrumento contém dois sistemas de lentes para ampliação de amostras: a lente ocular na ocular e a lente objetiva localizada na parte do nariz. A amostra é iluminada por um feixe de luz de tungstênio focado nela por uma lente de subestágio chamada condensador, e o resultado é que a amostra aparece escura contra um fundo brilhante. Uma grande limitação deste sistema é a ausência de contraste entre a amostra e o meio circundante, o que dificulta a observação de células vivas. Portanto, a maioria das observações em campo claro é realizada em preparações manchadas e não viáveis.

Darkfield Microscope

Isso é semelhante ao microscópio óptico comum; no entanto, o sistema do condensador é modificado para que a amostra não seja iluminada diretamente. O condensador direciona a luz de maneira oblíqua, de modo que a luz seja desviada ou dispersa do *spec-imen,* que então aparece brilhante contra um fundo escuro. As amostras vivas podem ser observadas mais prontamente no campo escuro do que na microscopia de campo claro.

Microscópio de contraste de fase

A observação de microrganismos em um estado não corado é possível com este microscópio. Suas ópticas incluem objetivos especiais e um condensador que torna visíveis os componentes celulares que diferem apenas ligeiramente em seus índices de refração. Como a luz é transmitida através de uma amostra com um índice de refração diferente daquele do meio circundante, uma parte da luz é refratada (dobrada) devido a pequenas variações na densidade e espessura dos componentes celulares. A ótica especial converte a diferença entre luz transmitida e raios refratados, resultando em uma variação significativa na intensidade da luz e produzindo assim uma imagem discernível da estrutura em estudo. A imagem aparece escura contra um fundo claro.

Microscópio fluorescente

Este microscópio é usado com mais frequência para visualizar amostras que são quimicamente marcadas com um corante fluorescente. A fonte de iluminação é uma luz ultravioleta (UV) obtida de uma lâmpada de mercúrio de alta pressão ou lâmpada de quartzo de hidrogênio. A lente ocular é equipada com um filtro que permite que os comprimentos de onda ultravioleta mais longos passem, enquanto os comprimentos de onda mais curtos são bloqueados ou eliminados. As radiações ultravioletas são absorvidas pelo rótulo fluorescente e a energia é reemitida na forma de um comprimento de onda diferente na faixa de luz visível. Os corantes fluorescentes absorvem em comprimentos de onda entre 230 e 350 nanômetros (nm) e emitem luz laranja, amarela ou esverdeada. Este microscópio é usado principalmente para a detecção de reações antígeno-anticorpo.

Microscópio eletrônico

Este instrumento fornece um método revolucionário de microscopia, com ampliações de até um milhão. Isso permite a visualização de partículas celulares submicroscópicas, bem como de agentes virais. No microscópio eletrônico, a amostra é iluminada por um feixe de elétrons em vez de luz, e o foco é realizado pelos eletromagnetos em vez de um conjunto de ópticas. Esses componentes são selados em um tubo no qual é estabelecido um vácuo completo. Os microscópios eletrônicos de transmissão requerem amostras finamente preparadas, fixadas e desidratadas para que o feixe de elétrons passe livremente por eles.

À medida que os elétrons passam pela amostra, as imagens são formadas direcionando os elétrons para o filme fotográfico, tornando visíveis as estruturas celulares internas.

Embora os cientistas tenham uma variedade de instrumentos ópticos para realizar procedimentos laboratoriais de rotina e pesquisas sofisticadas, o microscópio de campo claro composto é o "cavalo de batalha" e é comumente encontrado em todos os laboratórios biológicos. Embora você deva estar familiarizado com os princípios básicos da microscopia, você provavelmente não foi exposto a esse conjunto diversificado de equipamentos complexos e caros. Portanto, apenas o microscópio de campo claro composto será discutido em profundidade e usado para examinar as amostras.

UTILIZAÇÃO DO MICROSCÓPIO

OBJETIVOS

Para se familiarizar com:

1.Princípios teóricos da microscopia de campo claro.

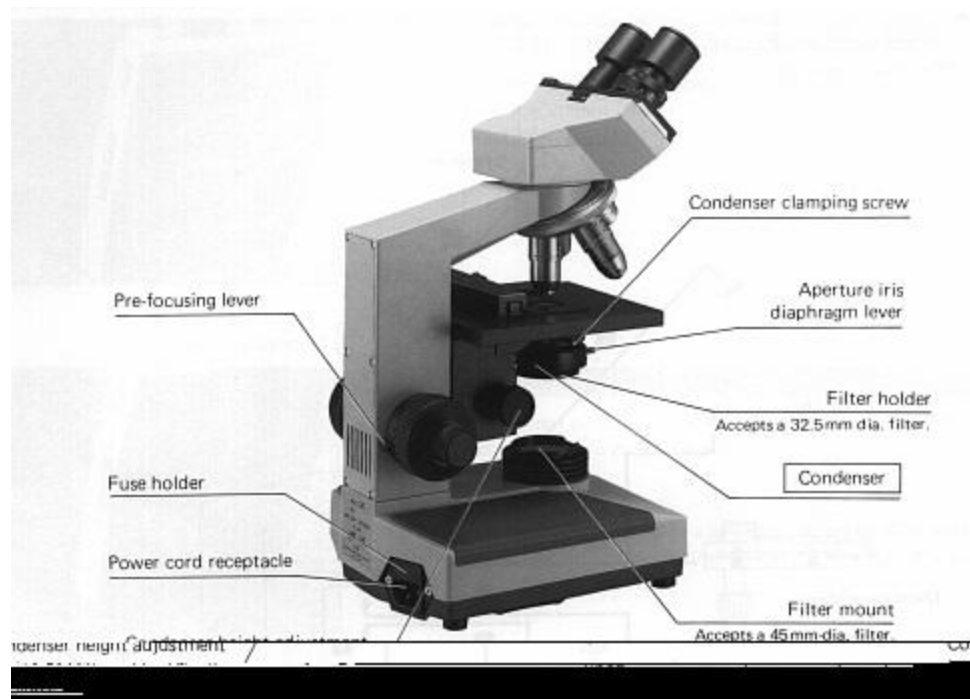
2. Partes componentes do micro-escopo composto.

3.Use e cuide do microscópio composto.

4. Uso prático do microscópio composto para visualização da morfologia celular de preparações com lâminas coradas.

PRINCÍPIO

Microbiologia é uma ciência que estuda organismos vivos que são pequenos demais para serem vistos a olho nu. Escusado será dizer que esse estudo deve envolver o uso de um bom microscópio composto. Embora existam muitos tipos e variações, todos consistem fundamentalmente em um sistema de duas lentes, uma fonte de luz variável, mas controlável e peças mecânicas ajustáveis para determinar a distância focal entre as lentes e a amostra.

Componentes do microscópio

Palco

Uma plataforma fixa com uma abertura no centro permite a passagem de luz de uma fonte de iluminação abaixo para o sistema de lentes acima do palco. Essa plataforma fornece uma superfície para a colocação de uma lâmina com sua amostra sobre a abertura central. Além do estágio fixo, a maioria dos microscópios possui um estágio mecânico que pode ser movido vertical ou horizontalmente por meio de controles de ajuste. Os microscópios menos sofisticados possuem clipes no palco fixo e o slide deve ser posicionado manualmente sobre a abertura central.

Iluminação

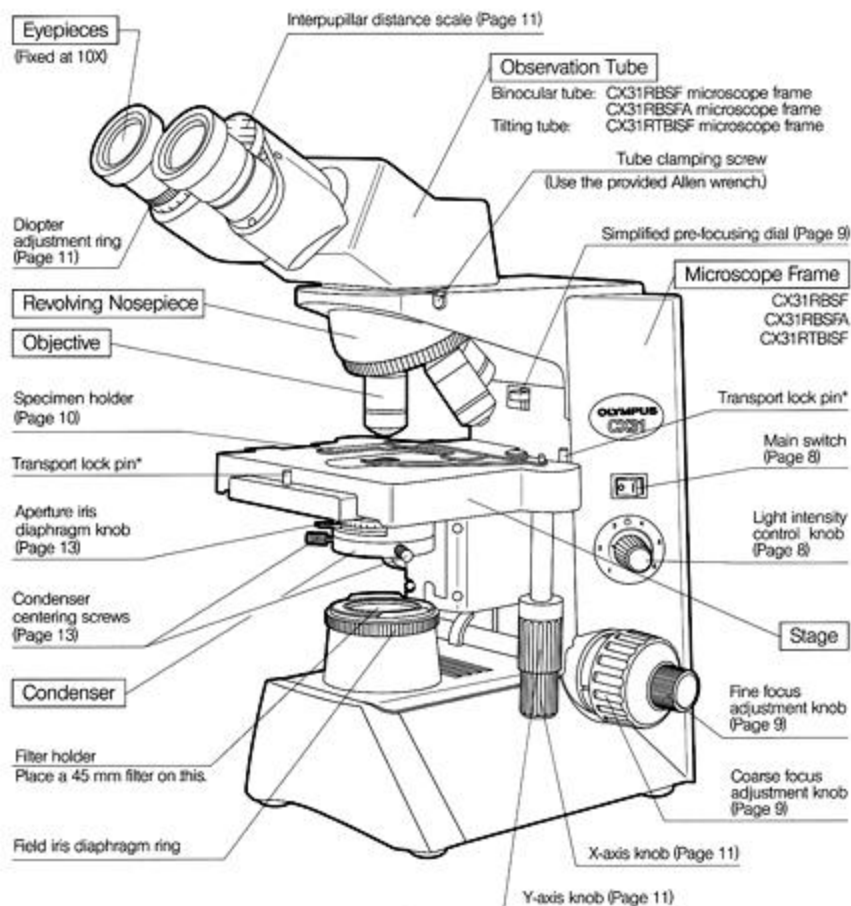
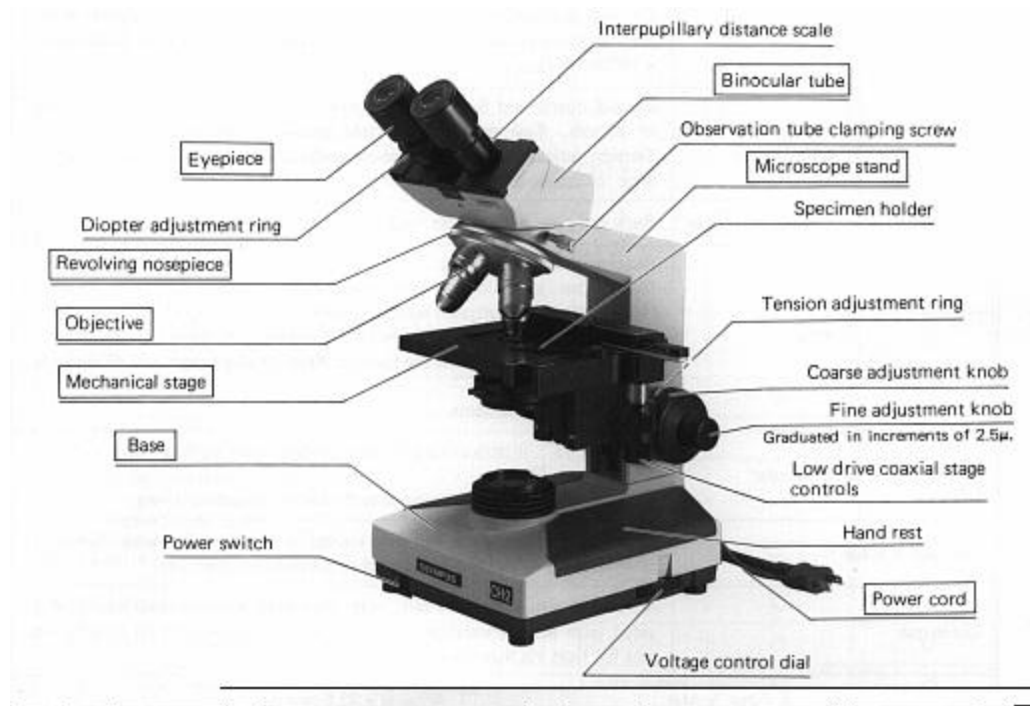
A fonte de luz está posicionada na base do instrumento. Alguns microscópios estão equipados com uma fonte de luz embutida para fornecer iluminação direta. Outros são fornecidos com um espelho; um lado plano e o outro côncavo.

Uma fonte de luz externa, como uma lâmpada, é colocada na frente do espelho para direcionar a luz para cima no sistema de lentes. O lado plano do espelho é usado para luz artificial e o lado côncavo para a luz solar.

Abbe Condenser

Esse componente é encontrado diretamente sob o palco e contém dois conjuntos de lentes que coletam e concentram a luz que passa para cima da fonte de luz para o sistema de lentes. O condensador está equipado com um diafragma de íris, um obturador controlado por uma alavanca usada para regular a quantidade de luz que entra no sistema de lentes.

Tubo do corpo

Acima do palco e preso ao braço do microscópio está o tubo do corpo. Essa estrutura abriga o sistema de lentes que amplia a amostra. A extremidade superior do tubo contém a lente ocular ou da ocular. A porção inferior consiste em um porta-nariz móvel contendo as lentes objetivas. A rotação do nariz posiciona as objetivas acima da abertura do palco. O tubo do corpo pode ser elevado ou abaixado com o auxílio de botões de ajuste grosso e ajuste fino localizados acima ou abaixo do palco, dependendo do tipo e marca do instrumento.

Princípios teóricos da microscopia

Para usar o microscópio com eficiência e com mínima frustração, você deve entender os princípios básicos da microscopia: ampliação, resolução, abertura numérica, iluminação e foco.

Ampliação

O aumento ou ampliação de uma amostra é a função de um sistema de duas lentes; a lente ocular é encontrada na ocular e a lente objetiva está situada em uma parte do nariz giratória. Essas lentes são separadas pelo tubo do corpo. A lente objetiva fica mais próxima da amostra e a amplia, produzindo a imagem real projetada no plano focal e depois ampliada pela lente ocular para produzir a imagem final.

Os microscópios mais usados são equipados com um porta-objetos giratório, contendo quatro lentes objetivas com diferentes graus de ampliação. Quando estes são combinados com a ampliação da lente ocular, é obtida a ampliação linear total ou total da amostra.

Resolução de energia ou resolução

Embora a ampliação seja importante, você deve estar ciente de que a ampliação ilimitada não é possível apenas aumentando o poder de ampliação das lentes ou usando lentes adicionais, porque as lentes são limitadas por uma propriedade chamada poder de resolução. Por definição, o poder de resolução é a capacidade de uma lente mostrar dois objetos adjacentes como entidades discretas. Quando uma lente não pode discriminar, ou seja, quando os dois objetos aparecem como um, ela perde a resolução. O aumento da ampliação não retifica a perda e, de fato, desfoca o objeto. O poder de resolução de uma lente depende do comprimento da onda da luz usada e da abertura numérica, que é uma característica de cada lente e impressa em cada objetivo. A abertura numérica é definida como uma função do diâmetro da lente objetiva em relação à sua distância focal. É

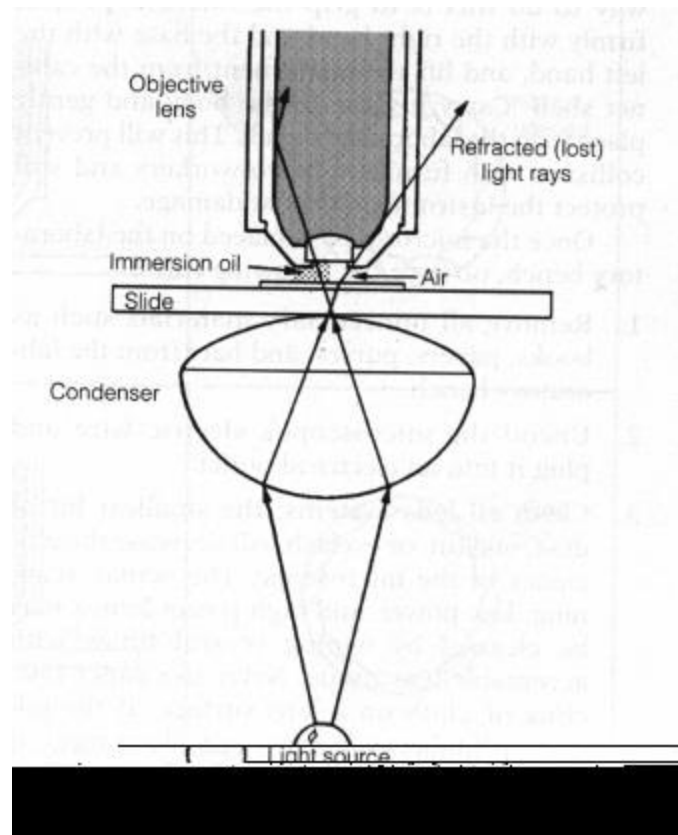
dobrado pelo uso do condensador de subestágio; que ilumina o objeto com raios de luz que atravessam a amostra obliquamente e diretamente. Assim, o poder de resolução é expresso matematicamente, da seguinte maneira:

Potência de resolução = Comprimento de onda da luz.

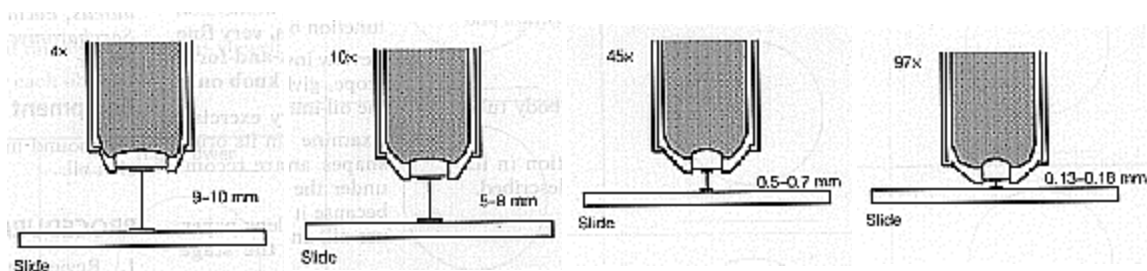
2 (Abertura Numérica)

Com base nessa fórmula, quanto menor o comprimento da onda, maior o poder de resolução da lente. Assim, comprimentos de onda curtos do espectro eletromagnético são mais adequados que comprimentos de onda mais longos em termos de abertura numérica.

Contudo; como na ampliação, o poder de resolução também tem limites. Você pode racionalizar que apenas diminuir o comprimento de onda aumentará automaticamente o poder de resolução de uma lente. Não é esse o caso, porque a porção visível do espectro eletromagnético é muito estreita e faz fronteira com os comprimentos de onda muito curtos encontrados na porção ultravioleta do espectro.

A relação entre comprimento de onda e abertura numérica é válida apenas para maior poder de resolução quando os raios de luz são paralelos. Portanto, o poder de resolução depende de outro fator, o índice de refração. Esse é o poder de flexão da luz que passa pelo ar da lâmina de vidro para a lente objetiva. O índice de refração do ar é menor que o do vidro e, à medida que os raios de luz passam do vidro para o ar, eles são curvados ou refratados, para que não passem para a lente objetiva. Isso causaria uma perda de luz, o que reduziria a abertura numérica e diminuiria o poder de resolução da lente objetiva. A perda de luz refratada pode ser compensada pela interposição de óleo mineral, que tem o mesmo índice de refração do vidro, entre a lâmina e a lente objetiva. Nesse caminho,

Iluminação

iluminação eficaz é necessário para ampliação eficiente e poder de resolução. Como a intensidade da luz do dia é uma variável não controlada, a luz artificial de uma lâmpada de tungstênio é a fonte de luz mais usada em microscopia. A luz é transmitida através da condenso localizado debaixo do palco. O condensador contém duas lentes necessárias para produzir uma abertura numérica máxima. A altura do condensador pode ser ajustada com o botão do condensador. Mantenha sempre o condensador próximo ao palco, principalmente ao usar a objetiva de imersão em óleo.

Entre a fonte de luz e o condensador está o diafragma da íris, que pode ser aberto e fechado por meio de uma alavanca; regulando assim a quantidade de luz que entra no condensador. A iluminação excessiva pode realmente obscurecer a amostra devido à falta de contraste. A quantidade de luz que entra no microscópio difere com cada lente objetiva usada. Uma regra prática é que, à medida que a ampliação da lente aumenta, a distância entre a lente objetiva e o slide, chamada distância de trabalho, diminui, enquanto a abertura numérica da lente objetiva aumenta.

Uso e Cuidados do Microscópio

Você será responsável pelo cuidado e uso adequados dos microscópios. Como os microscópios são caros, você deve observar os seguintes regulamentos e procedimentos.

Os instrumentos são alojados em armários especiais e devem ser movidos pelos usuários para as bancadas de laboratório. A maneira correta e única aceitável de fazer isso é agarrar firmemente o braço do microscópio com a mão direita e a base com a mão esquerda e levantar o instrumento da prateleira do gabinete. Leve-o para perto do corpo e coloque-o gentilmente na bancada do laboratório. Isso evitará colisões com móveis ou colegas de trabalho e protegerá o instrumento contra danos.

Depois que o microscópio for colocado na bancada do laboratório, observe as seguintes regras:

1. Remova todos os materiais desnecessários, como livros, papéis, bolsas e chapéus da bancada do laboratório.

2. Desenrole o fio elétrico do microscópio e conecte-o a uma tomada elétrica.

3.Limpe todos os sistemas de lentes; o menor pedaço de poeira, óleo, fiapos ou cílios diminuirá a eficiência do microscópio. O ocular; as lentes de varredura, baixa e alta potência podem ser limpas limpando várias vezes com um tecido aceitável. Nunca use papel ou pano na superfície da lente. Se a lente de imersão em óleo for gomosa ou pegajosa, um pedaço de papel para lente umedecido com metanol é usado para limpá-la. Se a lente estiver muito suja, ela pode ser limpa com *xilol;* no entanto, o procedimento de limpeza com xilol deve ser realizado apenas pelo instrutor e somente se necessário. O uso consistente de xilol pode afrouxar a lente.

Os procedimentos de rotina a seguir devem ser seguidos para garantir o uso correto e eficiente do microscópio durante o foco.

1. Coloque a lâmina do microscópio com a amostra dentro dos clipes do palco no palco fixo. Mova o slide para centralizar a amostra sobre a abertura no palco diretamente sobre a fonte de luz.

2. Gire a lente de digitalização ou a lente de baixa potência para a posição. Enquanto observa de lado para garantir que a lente não toque na amostra, gire o botão de foco aproximado para mover o palco o mais próximo possível da lente sem tocar na lente. (Sempre observe de lado sempre que mover uma amostra em direção a qualquer lente objetiva para garantir que ela não colide com a amostra e seja danificada!)

3. Agora, enquanto olha pela lente ocular, gire o botão de foco grosso com cuidado e afaste lentamente o palco da lente até que a amostra entre em foco vago. Em seguida, use o botão de foco fino para trazer a amostra para foco nítido.

4. Se este é o primeiro espécime do dia, você deve colocar o microscópio *Kohler* neste momento (enquanto estiver em foco). Caso contrário, se o seu microscópio já tiver sido Kohlered, você não precisará fazer isso novamente

5. Ajuste rotineiramente a fonte de luz por meio da configuração do transformador da fonte de luz e / ou diafragma da íris, para obter a iluminação ideal para cada novo slide e para cada alteração na ampliação.

6. Nossos microscópios são parfocais, o que significa que quando uma lente está focada, outras lentes também terão a mesma distância focal e podem ser rotacionadas para a posição sem maiores ajustes adicionais. Na prática, no entanto; geralmente é necessária meia volta do botão de ajuste fino em qualquer direção para obter um foco nítido.

7. Depois de colocar a amostra em foco nítido com uma lente de baixa potência, é possível preparar a visualização da imagem sob imersão em óleo. Coloque uma gota de óleo no slide diretamente sobre a área a ser visualizada. Gire a peça do nariz até que a objetiva de imersão em óleo se encaixe na posição. Deve-se tomar cuidado para não permitir que a objetiva de alta potência toque a gota de óleo. A lâmina é observada de lado enquanto a objetiva é girada lentamente na posição. Isso garantirá que o objetivo seja adequadamente imerso no óleo. O botão de ajuste fino é reajustado para focar a imagem.

8. Durante o exame microscópico de organismos microbianos, é sempre necessário observar várias áreas da preparação. Isso é feito digitalizando a lâmina sem a aplicação de óleo de imersão adicional. Isso exigirá ajustes contínuos e muito finos apenas com a rotação lenta e para trás do botão de ajuste fino.

Após a conclusão do exercício de laboratório, retorne o microscópio ao seu gabinete em sua condição original. As etapas a seguir são recomendadas:

1.Limpe todas as lentes com papel seco e limpo. Se necessário, você pode usar uma ou duas gotas de metanol para ajudar a limpar a lente. Use xilol para remover o óleo apenas do estágio.

2. Coloque o objetivo de baixa potência em posição e aproxime o palco e os objetivos.

3.Center o estágio mecânico.

4. Enrole o fio elétrico ao redor do tubo do corpo e do palco.

5. Leve o microscópio para sua posição em seu gabinete da maneira descrita anteriormente.